

## 明 細 書

## 変異アルカリセルラーゼ

## 技術分野

本発明は衣料用洗剤等に配合可能な変異アルカリセルラーゼに関する。

## 背景技術

衣料用洗剤使用時における洗濯液中のpHは、殆どがpH10～11までのアルカリ性領域にある。従って、衣料用洗剤に配合される酵素は、アルカリ性至適で且つアルカリ性環境下で安定なものが要求されてきた。

従来、衣料用洗剤等に配合可能なアルカリセルラーゼとしては、Bacillus 属に属する Bacillus sp. KSM-635 由来のアルカリセルラーゼ（特公昭60-23158号公報、特公平6-030578号公報、米国特許第4945053号明細書等）、Bacillus sp. KSM-64 由来のアルカリセルラーゼ（Shikata et al. Agric. Biol. Chem., 54, 91-96, 1990、Sumitomo et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 872-877, 1992）、中温性の好アルカリ性菌 Bacillus sp. KSM-S237（FERM-BP7875：平成9年2月6日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566））に寄託した）により生産される耐熱性アルカリセルラーゼ（特開平10-313859号公報）、Bacillus sp. KSM-N257 由来のアルカリセルラーゼ（特願平12-281378号）、Bacillus sp. KSM-N131 由来のアルカリセルラーゼ（特願平12-373859号）等が知られているが、これらはカルボキシメチルセルロース（CMC）を基質とした場合の最適反応pHがいずれも9付近であり、洗濯に対して最適なpHを有するものではない。

一方、糖質分解酵素において、その最適反応 pH を変化させるという研究としては、好アルカリ性 Bacillus 由来のアルカリセルラーゼ (NK1) と Bacillus subtilis 由来の中性セルラーゼ (BSC) のキメラタンパク質を構築し、その pH 特性を変化させた例が報告されているが、これは、最適 pH をアルカリ性から中性にシフトさせたものである (Park et al., Protein Eng., 6, 921-926, 1993)。

また最近では、Trichoderma reesei 由来のセロビオヒドロラーゼ (Cel7A) に関し、その活性中心近傍のアミノ酸を置換することで、野生型と比較してより最適 pH を上昇させた報告がなされているが (Beker et al., Biochem. J., 356, 19-31, 2001)、これは野生型酵素の最適 pH が酸性領域にあり、その変異体の最適 pH は 1 pH ユニット以内の上昇にすぎない。

このように、糖質分解酵素においては、その最適反応 pH をアルカリ性側にシフトさせた報告例は殆ど無いのが実情である。

本発明は、アルカリセルラーゼの遺伝子を改変することによって、洗剤用酵素として最適の pH を有する変異アルカリセルラーゼを提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、配列番号 1 に示すアルカリセルラーゼ (Eg1-237) について、その活性ドメインを中心に立体構造を予測し、部位特異的変異法により種々の変異を導入することにより目的の酵素を探索した結果、ループ構造の一部を構成する特定領域のアミノ酸残基を欠失させ、当該部位に新たなペプチドを挿入することで、CMC 分解活性における最適反応 pH を上昇できることを見出した。

すなわち本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又はこれと 90% 以上の相同性を有するセルラーゼについて、配列番号 1 の 343 位～377 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる 1 以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 2～15 のペプチドを挿入した変異アルカリセルラーゼ、及び

それをコードする遺伝子を提供するものである。

また本発明は、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1 a～1 cは、配列番号1で示されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するセルラーゼのアミノ酸配列を整列させた図である。

図2は、アラニン－グリシン－アラニン変異体の最適反応pHを示す図である。

図3は、アラニン－ヒスチジン－アラニン変異体の最適反応pHを示す図である。

図4は、アラニン－アルギニン－アラニン変異体の最適反応pHを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の変異アルカリセルラーゼは、配列番号1で示されるアミノ酸配列又はこれと90%以上の相同性を有するセルラーゼを変異の対象となるセルラーゼ（以下、「親アルカリセルラーゼ」ともいう）とし、当該配列番号1の343位～377位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～15のペプチドを挿入してなるものであり、親アルカリセルラーゼは野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

ここで、親アルカリセルラーゼである配列番号1に示すアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するセルラーゼとしては、当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を示すものがより好ましく、98%以上の相同性を示すものがさらに好ましく、これらは野生型又は野生型の変異体であってもよい。尚、アミノ酸配列の相同性はGENETYX-WINのマキシマムマッチングやサーチホモロジー等の

プログラム（ソフトウェア開発）を用いて計算することができる。

また、斯かる配列番号1で示されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するセルラーゼは、ホモロジーモデリングの手法を用い、3D-1D、XPLORE及びPROCHECKプログラムによりセルラーゼの分子構造を予測した場合に、配列番号1において42番目のロイシンから404番目のバリンまでの活性ドメイン領域と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有し、且つ配列番号1における343番目のアスパラギンから377番目のロイシンに相当するアミノ酸配列がセルラーゼ分子内においてループ構造を有しているものが好ましい。尚、この場合のアミノ酸配列の相同性は、例えばLipman-Pearson法（Science, 227, 1435, 1985）等に従って計算することができる。

また親アルカリセルラーゼは、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法あるいはゲル濾過法により得られる分子量が $86,000 \pm 2,000$ である、カルボキシメチルセルロースを基質とした場合の最適反応pHが7.5～9.0の間にある、最適反応温度が40～50℃の範囲にある、等の性質を有しているのが好ましく、更にカルボキシメチルセルロースのほかにリケナンを良好に分解することが好ましく、pH9で50℃、10分間の処理においても十分に安定であることが好ましい。

特に、分子量が $86,000 \pm 2,000$ （SDS-PAGEあるいはSephacryl S200カラムによるゲル濾過法）、最適反応pHが8.6～9.0、最適反応温度が50℃、カルボキシメチルセルロースのほかにリケナンを良好に分解し、pH9、5mM塩化カルシウム存在下で50℃、10分間の処理を行った場合95%以上（30℃、10分間処理時の残存活性を100%とする）の残存活性を認めるような性質を有するものが好ましい。

以上より、本発明における親アルカリセルラーゼとしては、配列番号1に示す

アルカリセルラーゼの他、前述したように配列番号1の特定の活性ドメイン領域と高い相同性を有し、且つ配列番号1における特定のアミノ酸配列がセルラーゼ分子内においてループ構造を有するというアミノ酸配列上の特徴を有するもの及び／又は上記の酵素学的性質を有するもの、特に当該アミノ酸配列上の特徴を有し且つ当該酵素学的性質を有するものであり、配列番号1に示すアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を示すものが好ましい。

具体的には、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ」であるEg1-237 [バチルス エスピー KSM-S237 (FERM B P-7875) 由来、Hakamada ら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2281-2289, 2000]、バチルス エスピー 1139株由来のアルカリセルラーゼ (Eg1-1139) (Fukumori ら, J. Gen. Microbiol, 132, 2329-2335) (相同性91.4%)、バチルス エスピー KSM-64株由来のアルカリセルラーゼ (Eg1-64) (Sumitomo ら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 872-877, 1992) (相同性91.9%)、バチルス エスピー KSM-N131株由来のセルラーゼ (Eg1-N131b) (特願2000-47237号) (相同性95.0%) 等が挙げられる。

本発明の変異アルカリセルラーゼは、上記親アルカリセルラーゼにおいて、配列番号1の343位～377位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～15のペプチドを挿入してなるものである。

欠失させるアミノ酸残基は、配列番号1の343位～377位における任意の連続又は非連続の1～35個のアノ酸残基であればよく、好ましくは350位～377位中、より好ましくは355位～365位中、更に好ましくは357位～362位中のアノ酸残基である。

特に、343位～377位中の任意の1～27残基、2～15残基又は3～1

0 残基、3 5 5 位～3 7 7 位中の任意の 1～8 残基、3～6 残基又は全てのアミノ酸残基、3 5 7 位～3 6 2 位中の任意の 2 残基、2～5 残基又は全てのアミノ酸残基が好ましい。

斯かる配列番号 1 の 3 4 3 位～3 7 7 位のアミノ酸領域は、ホモロジーモデリングによる立体構造解析 (Ozawa *et al.*, *Protein Eng.*, 14, 501-504, 2001) によれば、E g 1-2 3 7 の活性中心から比較的離れた位置に存在し、自由度が高く、且つセルラーゼ構造の維持に深く関与しているループ構造の一部を形成する領域であると推定される。

尚、「配列番号 1 の 3 4 3 位～3 7 7 位に相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリセルラーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。セルラーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各セルラーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である (図 1 a～1 c)。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のセルラーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ (E g 1-2 3 7) の 3 5 7 位～3 6 2 位に相当する位置を、前述した E g 1-1 1 3 9、E g 1-6 4、E g 1-N 1 3 1 b について示せば、下記表 1 のとおりである。

表 1

Egl-237	Egl-1139	Egl-64	Egl-N131b
357Gly	357Gly	357Gly	343Gly
358Lys	358Lys	358Lys	344Lys
359Ser	359Ser	359Ser	345Ser
360Asn	360Asn	360Asn	346Asn
361Ala	361Ala	361Ala	347Ala
362Thr	362Thr	362Thr	348Thr

斯かる欠失部位に挿入すべきペプチドとしては、20種類の必須アミノ酸のいずれから構成されていてもよいが、アラニン、グリシン、ヒスチジン、アルギニンを含むものが好ましく、特にアラニンとグリシン、アラニンとヒスチジン、アラニンとアルギニンを含むものが好ましい。

また、ペプチドを構成するアミノ酸残基の数としては、2～15個であるのが好ましく、2～10個、更には2～6個であるのが好ましく、特に3個であるのが好ましい。

斯かるペプチドの好適な例としては、例えばアスパラギン－スレオニン－アラニン－バリン－グリシン－イソロイシン、アラニン－セリン－メチオニン－ロイシン－フェニルアラニン－グルタミン酸、システイン－ロイシン－グリシン－ヒスチジン－セリン、チロシン－グルタミン－リジン－アラニン－アラニン、アスパラギン酸－メチオニン－イソロイシン－バリン、イソロイシン－スレオニン－プロリン－リジン、グリシン－ロイシン－システイン、セリン－バリン－フェニルアラニンが挙げられるが、中でも両末端にアラニン残基を有する3～6残基のペプチドが好ましく、アラニン－任意の1個のアミノ酸－アラニンがより好ましく、アラニン－グリシン－アラニン、アラニン－ヒスチジン－アラニン又はアラニン－アルギニン－アラニンが特に好ましい。

また、本発明の変異アルカリセルラーゼには、アルカリセルラーゼ活性並びに改変された特性を失わない限り、上記の変異とは別に、アミノ酸配列中において1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたものも包含する。

本発明の変異アルカリセルラーゼは、親アルカリセルラーゼに対し目的の変異を導入すればよく、例えば以下の方法により行われる。

すなわち、親アルカリセルラーゼを培養して得られた培養液から遠心分離により菌体を分離し、該菌体からのアルカリセルラーゼ遺伝子を含んだ染色体DNAを調製〔例えば、マーマーの方法 (*J. Mol. Biol.*, **3**, 208-212, 1961) や斎藤と三浦の方法 (*Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619-629, 1963) 〕し、ショットガンクローニング法やPCR法を用いて親アルカリセルラーゼ（例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ）をコードする遺伝子（配列番号2）をクローニングすることができる。クローニングされた遺伝子に対し変異を導入し、変異遺伝子を含むプラスミドを用いて適当な宿主菌を形質転換し、形質転換株を培養することによってその培養物から本発明の変異アルカリセルラーゼを得ることができる。

親アルカリセルラーゼをコードする遺伝子に変異を導入する方法としては、部位特異的変異法等を用いることができる。例えばTakara社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km kit等を使用することができる。変異が導入されたアルカリセルラーゼ遺伝子は適当なベクターに組込むことができる。

ここで使用可能なベクターとしては、宿主菌内で複製維持可能であり、アルカリセルラーゼ遺伝子を発現させることができ、組込まれた該遺伝子を安定に保持できれば如何なるものも使用可能である。例えば、*Bacillus*属細菌を宿主とする場合、pUB110やpHY300PLK等が挙げられ、大腸菌を宿主とする場合、pUC18、pUC19、pBR322或いはpHY300PLK等が挙げられる。



かくして得られた組換えベクターを用いて宿主菌を形質転換するにはプロトプラスト法、コンピテントセル法、エレクトロポレーション法等を用いて行うことができる。宿主菌としては特に制限されないが Bacillus 属（枯草菌）等のグラム陽性菌、Escherichia coli（大腸菌）等のグラム陰性菌、Streptomyces 属（放線菌）、Saccharomyces 属（酵母）、Aspergillus 属（カビ）等の真菌が挙げられる。

得られた形質転換体は、資化しうる炭素源、窒素源、金属塩、ビタミン等を含む培地を用いて適当な条件下で培養すればよい。かくして得られた培養液から、一般的な方法によって酵素の分取や精製を行い、凍結乾燥、噴霧乾燥、結晶化により必要な酵素形態を得ることができる。

かくして得られる変異アルカリセルラーゼの最適反応 pH は、親アルカリセルラーゼの値よりも高く、好ましくは、pH 9.0～9.5、より好ましくは pH 9.5～10.0 まで高アルカリ側にシフトしているものである。さらに変異アルカリセルラーゼの最適反応 pH 以外の諸性質は、前述した親アルカリセルラーゼの諸性質を保持していることが好ましい。

## 実施例

### 実施例 1 E g 1－2 3 7 のループ領域の改変

E g 1－2 3 7 の分子モデルは、既に結晶構造が解析されている C e 1 K の解析データを基にホモロジーモデリングにより構築し、モデル構造の精密化は、3 D－1 D、X P L O R E 及び P R O C H E C K プログラムにより行った。次いで、得られた情報を基にループ構造内の一部のアミノ酸（3 5 7 番グリシンから 3 6 2 番スレオニン）を欠失させると同時にアラニン－グリシン－アラニン、アラニン－ヒスチジン－アラニン及びアラニン－アルギニン－アラニンを新たに導入した。このループ領域の変異には、それぞれ変異導入プライマー 1、2 及び 3（配列番号 3、4 及び 5）を用い、アンチセンスプライマーには変異導入プライマー

4 (配列番号6) を用いた。アラニン-グリシン-アラニン変異導入においては、鋳型DNAとしてpHY300PLK中に組換えられたEg1-237遺伝子を用いた。アラニン-ヒスチジン-アラニン及びアラニン-アルギニン-アラニン変異導入には鋳型DNAにpHY300PLK中に組換えられたアラニン-グリシン-アラニン変異体プラスミドを用いた。具体的には、鋳型DNAプラスミド0.5 $\mu$ L(10ng)、変異導入用プライマー20 $\mu$ L(1 $\mu$ M)、アンチセンスプライマー20 $\mu$ L(1 $\mu$ M)、10倍濃度のPCR用緩衝液10 $\mu$ L、10mMデオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)混液8 $\mu$ L、PyrobestDNAポリメラーゼ0.5 $\mu$ L(2.5units、タカラ)及び脱イオン水39.5 $\mu$ Lを混合した後、gene amp PCR system9700(アマシャムファルマシア)でPCRを行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C2分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C1分間、60 $^{\circ}$ C1分間、72 $^{\circ}$ C1.5分間(30サイクル)及び72 $^{\circ}$ C3分間で行った。得られたPCR産物をGFX PCR DNA and gel band purification kit(アマシャムファルマシア)で精製後(43.5 $\mu$ L)、5.5 $\mu$ Lの10倍濃度のリン酸化用緩衝液及びpolynucleotide kinase1 $\mu$ L(10units)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間リン酸化反応を行った後、精製した。リン酸化されたPCR産物25 $\mu$ Lに、鋳型プラスミドを2 $\mu$ L(20ng)、10倍濃度のPCR用緩衝液10 $\mu$ L、10mM dNTP混液8 $\mu$ L、PyrobestDNAポリメラーゼ1 $\mu$ L(5units)及び脱イオン水54 $\mu$ Lを混合した後、PCRを行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C2分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C1分間、58 $^{\circ}$ C1分間、72 $^{\circ}$ C6分間(30サイクル)及び72 $^{\circ}$ C12分間で行った。得られたPCR産物を精製後(43.5 $\mu$ L)、5.5 $\mu$ Lの10倍濃度のリン酸化用緩衝液及びポリヌクレオチドキナーゼ1 $\mu$ L(10units)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間リン酸化反応を行った。エタノール沈澱により回収された10 $\mu$ LのDNA溶液をligation kit ver. 2(タカラ)を用いて16 $^{\circ}$ Cで18時間ライゲーション反応を行い、自

己閉環した後、再度エタノール沈殿によりDNA混液を回収した。

## 実施例2 形質転換法

実施例1で得られたDNA混液5  $\mu$ Lを用いて Bacillus subtilis ISW1214株に導入して形質転換体を取得した (Chang and Cohen, Mol. Gen. Gent., 168, 111, 1979)。この方法により得られたプロトプラストをテトラサイクリン (15  $\mu$ g/mL、シグマ) を含むDM3再生寒天培地[0.8% (w/v) 寒天 (和光純薬)、0.3M コハク酸二ナトリウム6水和物、0.5% カザミノ酸テクニカル (ディフコ)、0.5% 酵母エキス、0.35%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.15%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.5% グルコース、0.4%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% 牛血清アルブミン (シグマ)、0.5% CMC (関東科学)、0.005% トリパンプルー (メルク) 及びアミノ酸混液 (ロイシン、メチオニン10  $\mu$ g/mL)]上に塗抹し、30°Cで72時間培養して形質転換体を得た。DM3再生寒天平板培地上で、ハローを形成した形質転換体をテトラサイクリン (15  $\mu$ g/mL) を含んだポリペプトン培地 (3% ポリペプトンS、3% マルトース、0.5% 魚肉エキス (和光純薬)、0.1% 酵母エキス、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) で、30°C、15時間振とう培養を行い、集菌後、micro prep plasmid purification kit (アマシャムファルマシア) によりプラスミドを回収、精製した。取得したプラスミド中に挿入されたセルラーゼ遺伝子の変異配列の確認は、377 DNAシーケンサー (アプライドバイオシステム) を用いて行なった。変異導入近辺の領域を解読できるような適当なシーケンス用プライマーを用いて塩基配列解析を行い、目的の変異が導入されているプラスミドを選別した。

## 実施例3 セルラーゼ変異体の生産

宿主菌 B. subtilis ISW1214株の培養は、3% ポリペプトンS (日本製薬製)、0.5% 魚肉エキス、0.05% 酵母エキス、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、テトラサイクリン (15  $\mu$ g/mL)

mL) 及び5% マルトースを含んだ培地を用いて、30℃で72時間行った。

各種変異体を培養した結果、ループ領域変異体アラニン-グリシン-アラニンのセルラーゼ活性量は36800 U/L、アラニン-ヒスチジン-アラニンの活性量は34700 U/L 及びアラニン-アルギニン-アラニンの活性量は32400 U/Lであった。

尚、セルラーゼ活性は、3, 5-ジニトロサリチル酸 (DNS) 法により測定した。

即ち、0.2 mLの0.5 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0)、0.4 mLの2.5% (w/v) カルボキシメチルセルロース (A01MC; 日本製紙)、0.3 mLの脱イオン水から成る反応液に0.1 mLの適当に希釈した酵素液を加え40℃、20分間反応させた後、1 mLのジニトロサリチル酸試薬 (0.5% ジニトロサリチル酸、30% ロッシェル塩、1.6% 水酸化ナトリウム水溶液) を添加し、沸水中で5分間還元糖の発色を行った。氷水中で急冷し、4 mLの脱イオン水を加え535 nmにおける吸光度を測定し還元糖の生成量を求めた。ブランクは酵素液を加えずに処理した反応液にジニトロサリチル酸試薬を加えた後、酵素液を添加し、同様に発色させたものを用意した。酵素1単位 (1 U) は、上記反応条件下において1分間に1  $\mu$ molのグルコース相当の還元糖を生成する量とした。

#### 実施例4 組換えセルラーゼループ改変体の精製

組換えセルラーゼループ改変体の培養上清液を脱イオン水にて10倍に希釈した後、予め、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したDEAEトヨパール (東ソー) カラム (2.5 cm × 5 cm) に添着した。同緩衝液でカラムを洗浄した後、同緩衝液中0~0.4 Mの塩化ナトリウム400 mLによる直線濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。目的の組換えセルラーゼループ改変体は、塩化ナトリウム濃度0.25 M付近で、電気泳動的にほぼ単一な成分として溶出された。脱塩濃縮は、限外濾過膜 (PM10、ミリポア) を用いて行った。

#### 実施例 5 組換えセルラーゼループ改変体の最適反応 pH

実施例 4 で得られた組換えセルラーゼループ改変体の精製標品を用いて、酵素反応に及ぼす pH の影響を調べた。グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.2 ~ 10.9) を用いて最適反応 pH を調べた結果、組換え野生型セルラーゼの最適反応 pH は、pH 9.0 であるのに対し、アラニン-グリシン-アラニン変異体のセルラーゼの最適反応 pH は、pH 10 と 1 pH ユニット高アルカリ性側にシフトすることが判った (図 2)。また、アラニン-ヒスチジン-アラニン変異体及びアラニン-アルギニン-アラニン変異体の最適反応 pH は、9.6 付近であり、さらに pH 8.8 から pH 9.9 の活性は最適 pH 9.6 での活性を 100% とした場合、相対値 95% 以上と親セルラーゼやアラニン-グリシン-アラニン変異体に比べ高くなっていることも判った (図 2、3)。

#### 産業上の利用可能性

本発明の変異アルカリセルラーゼは、洗濯液中の pH (pH 10.5 付近) に近い最適 pH を有し、洗剤用酵素として有用である。

## 請求の範囲

1. 配列番号1で示されるアミノ酸配列又はこれと90%以上の相同性を有するセルラーゼについて、配列番号1の343位～377位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～15のペプチドを挿入した変異アルカリセルラーゼ。
2. 配列番号1の357位～362位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～5のペプチドを挿入した請求項1記載の変異アルカリセルラーゼ。
3. 配列番号1の357位～362位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基を全て欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数3のペプチドを挿入した請求項1又は2記載の変異アルカリセルラーゼ。
4. 挿入するペプチドが、アラニン及びグリシン、アラニン及びヒスチジン、又はアラニン及びアルギニンのいずれかを構成アミノ酸残基として含むものである請求項1～3のいずれか1項記載の変異アルカリセルラーゼ。
5. 挿入するペプチドが、アラニン－グリシン－アラニン、アラニン－ヒスチジン－アラニン又はアラニン－アルギニン－アラニンである請求項1～4のいずれか1項記載の変異アルカリセルラーゼ。
6. 請求項1～5記載の変異アルカリセルラーゼをコードする遺伝子。
7. 請求項6記載の遺伝子を含む組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターを含む形質転換体。
9. 宿主が微生物である請求項8記載の形質転換体。

图 1 a

Eg1-237 1:MMLRKKTQQLISSILILVLLSLFPALAAEGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLEQVDGQMTLVLDQHGEKIQLRCGMSTHGLQWFF 90

Eg1-1139 1:MMLRKKTQQLISSILILVLLSLFPALAAEGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLEQVDGQMTLVLDQHGEKIQLRCGMSTHGLQWFF 90

Eg1-64 1:MMLRKKTQQLISSILILVLLSLFPALAAEGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLEQVDGQMTLVLDQHGEKIQLRCGMSTHGLQWFF 90

Eg1-N131b 1:MMLRKKTQQLGR-----PAQA---EGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLEQVDGQMTLVLDQHGEKIQLRCGMSTHGLQWFF 76

\*\*\*\*\*  
\*  
\*\*\*\*\*

Egl-237	91:EILNDNAVKALSNDWDSNMIRLAMYVGENGYSATNPBLIKQRVIDGIELAIENDMYVIVDWHVHAPGDPRDPVYAGAKDFFREIAALYPNN	180
Egl-1139	91:EILNDNAVKALANDWESNMIRLAMYVGENGYSANPELIKSRVIKGIDLAIENDMYVIVDWHVHAPGDPRDPVYAGAEFFRDIAALYPNN	180
Egl-64	91:EILNDNAVKALANDWESNMIRLAMYVGENGYSANPELIKSRVIKGIDLAIENDMYVIVDWHVHAPGDPRDPVYAGAEFFRDIAALYPNN	180
Egl-N131b	77:EILNDNAVKALSNDWDSNMIRLAMYVGENGHATNPBLIKQRVIDGIELAIENDMYVIVDWHVHAPGDPRDPVYAGAKDFFREIAALYPNN	166
	***** * * * * *	
Egl-237	181:PHIIYELANEPSSNNGGACIPNNEEGWKAVEYADPIVEMLRKSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMTYVHFYTGSAA	270
Egl-1139	181:PHIIYELANEPSSNNGGACIPNNEEGWNAVEYADPIVEMLRDMSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMTYVHFYTGSAA	270
Egl-64	181:PHIIYELANEPSSNNGGACIPNNEEGWNAVEYADPIVEMLRDMSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMTYVHFYTGSAA	270
Egl-N131b	167:PHIIYELANEPSSNNGGACIPNNEEGWKAVEYADPIVMRLRKSNGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMTYVHFYTGSAA	256
	***** * * * * *	
Egl-237	271:STESYPETPNSERGVMSNTRYALENGVAVFATEWGTSQAGDGPGFYDEADVIEFLNENNISWANWSLTNKNEVSGAFTPFELGKSN	360
Egl-1139	271:STESYPETPNSERGVMSNTRYALENGVAVFATEWGTSQANGDGPGFYDEADVIEFLNENNISWANWSLTNKNEVSGAFTPFELGKSN	360
Egl-64	271:STESYPETPNSERGVMSNTRYALENGVAVFATEWGTSQANGDGPGFYDEADVIEFLNENNISWANWSLTNKNEVSGAFTPFELGKSN	360
Egl-N131b	257:STESYPETPNSERGVMSNTRYALENGVAVFATEWGTSQANGDGPGFYDEADVIEFLNENNISWANWSLTNKNEVSGAFTPFELGKSN	346
	***** * * * * *	

[illegible]



1 c

Eg1-237 721: INVROITNIQDDTLLRNMMIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEGAATTEPVEPEVPDPGEETPPVDEKEAKKEQKAEKEKEAVKEEKKEA 810  
Eg1-1139 719: INVROITNIQDDTLLRNMMIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEGAATTEPVEPEVPDPGEETPPVDEKEAKKEQKAEKEKEE----- 800  
Eg1-64 719: INVROITNIQDDTLLRNMMIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEGAATTEPVEPEVPDPGEETPPVDEKEAKKEQKAEKEKEAVKEEKKEA 808  
Eg1-N131b 707: INVROITNIQDDTLLRNMMIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEGAATTEPVEPEVPDPGEETPPVDEKEAKKEQKAEKEKEAVKEEKKEA 796  
\*\*\*\*\*  
Eg1-237 811: KEEKKAVKNEAKKK 824  
Eg1-1139 801: ----- 801  
Eg1-64 809: KEEKKAIKNEATKK 822  
Eg1-N131b 797: KEEKKAIKNEATKK 810

.....

図 2

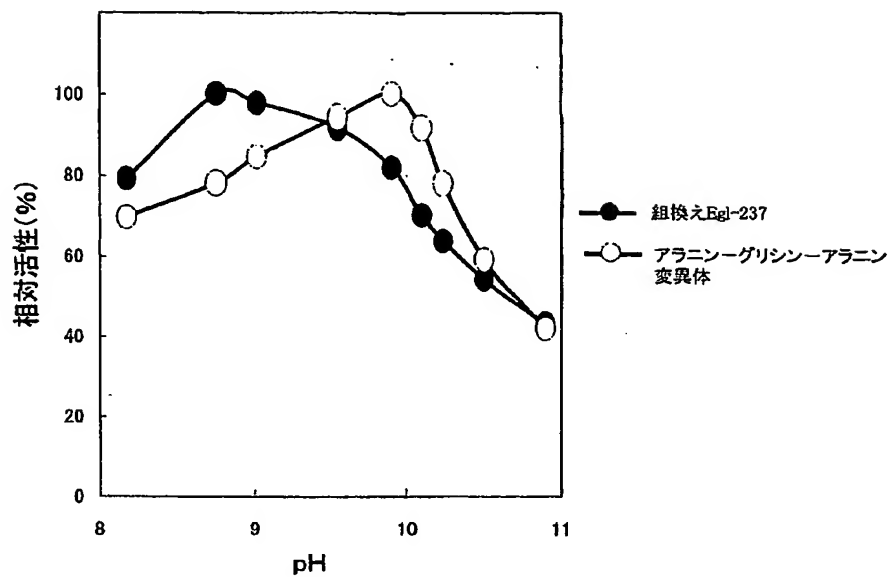


図 3

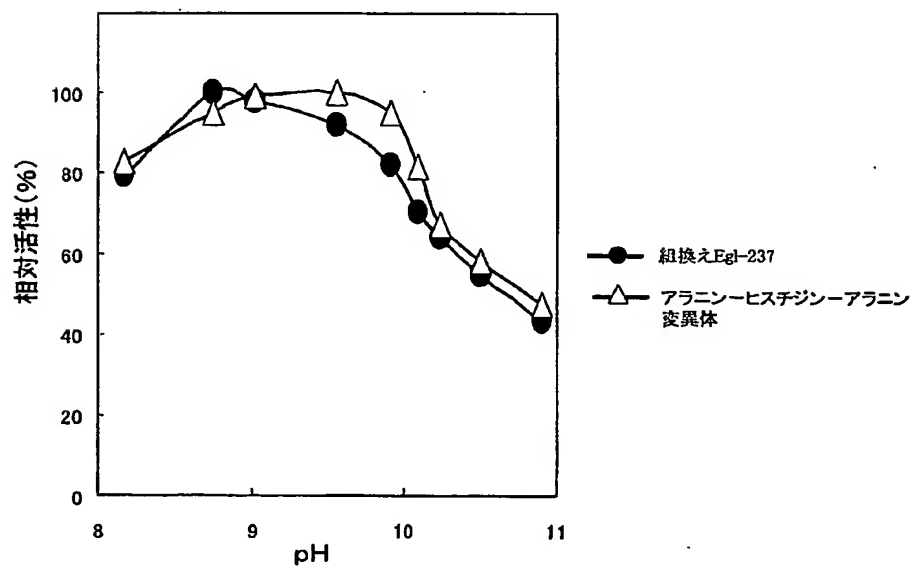
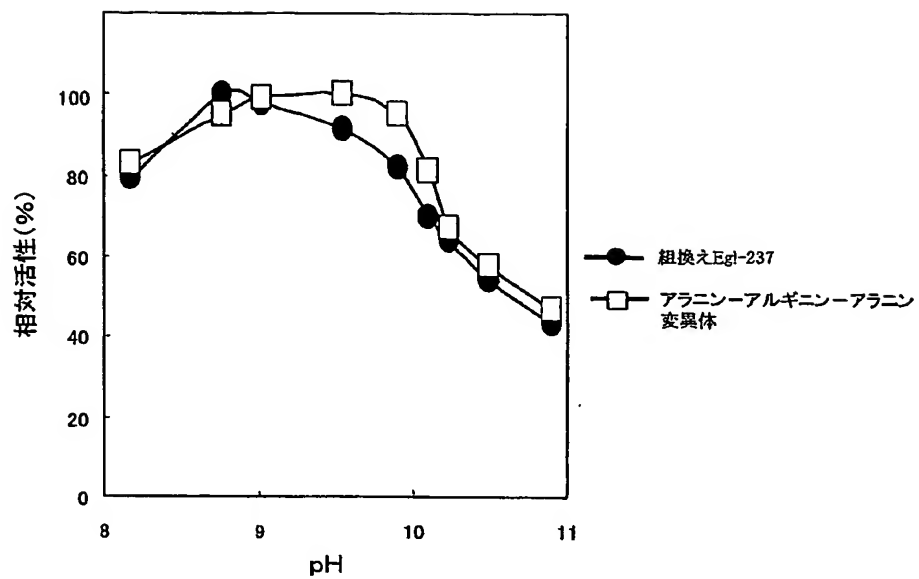


図 4



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KAO CORPORATION

&lt;120&gt; Mutant alkali cellulase

&lt;130&gt; P

&lt;150&gt; JP P2002-124474

&lt;151&gt; 2002-04-25

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 824

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus sp.KSM-S237

&lt;400&gt; 1

```

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile
  1             5             10             15
Leu Val Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly
      20             25             30
Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val
      35             40             45
Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly
      50             55             60
Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly
      65             70             75             80
Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn
      85             90             95
Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu
      100            105            110
Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile
      115            120            125
Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met
      130            135            140
Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp
      145            150            155            160
Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu
      165            170            175
Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser
      180            185            190
Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp
      195            200            205

```

Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His  
 245 250 255  
 Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr  
 260 265 270  
 Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met  
 275 280 285  
 Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr  
 290 295 300  
 Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp  
 325 330 335  
 Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr  
 340 345 350  
 Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro  
 355 360 365  
 Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val  
 370 375 380  
 Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn  
 420 425 430  
 Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val  
 435 440 445  
 Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp  
 450 455 460  
 Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val  
 465 470 475 480  
 Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser  
 485 490 495  
 Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala  
 500 505 510  
 Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr  
 515 520 525  
 Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu  
 530 535 540  
 Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
 565 570 575

Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
 580 585 590  
 Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
 595 600 605  
 Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala  
 610 615 620  
 Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp  
 625 630 635 640  
 Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly  
 645 650 655  
 Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala  
 660 665 670  
 Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn  
 675 680 685  
 Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu  
 690 695 700  
 Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys  
 705 710 715 720  
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg  
 725 730 735  
 Asn Met Met Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg  
 740 745 750  
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro  
 755 760 765  
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp  
 770 775 780  
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys  
 785 790 795 800  
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala  
 805 810 815  
 Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys  
 820

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2475

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-S237

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (2475)

&lt;400&gt; 2

atg atg tta aga aag aaa aca aag cag tlg att tct tcc att att att 48  
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile

1	5	10	15	
tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga	96			
Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly				
20	25	30		
aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt	144			
Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val				
35	40	45		
aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga	192			
Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly				
50	55	60		
caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga	240			
Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly				
65	70	75	80	
atg agt aca cac gga tta cag tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac	288			
Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn				
85	90	95		
gca tac aaa gct ctt tct aac gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt	336			
Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu				
100	105	110		
gct atg tat gta ggt gaa aat ggg tac gct aca aac cct gag tta atc	384			
Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile				
115	120	125		
aaa caa aga gtg att gat gga att gag tta gcg att gaa aat gac atg	432			
Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met				
130	135	140		
tat gtt att gtt gac tgg cat gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat	480			
Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp				
145	150	155	160	
cct gtt tat gca ggt gct aaa gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta	528			
Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu				
165	170	175		
tac cct aat aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag ccg agt	576			
Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser				
180	185	190		

agt aat aat aat ggt gga gca ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg 624  
 Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp  
 195 200 205

aaa gcg gta aaa gaa tat gct gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa 672  
 Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys  
 210 215 220

agc ggt aat gca gat gac aac att atc att gtt ggt agt cca aac tgg 720  
 Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp  
 225 230 235 240

agt cag cgt ccg gac tta gca gct gat aat cca att gat gat cac cat 768  
 Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His  
 245 250 255

aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct tca act 816  
 Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr  
 260 265 270

gaa agc tat ccg tct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac gta atg 864  
 Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met  
 275 280 285

agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca 912  
 Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr  
 290 295 300

gag tgg gga acg agt caa gct agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat 960  
 Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp  
 305 310 315 320

gaa gca gat gta tgg att gaa ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg 1008  
 Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp  
 325 330 335

gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca 1056  
 Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr  
 340 345 350

cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca 1104  
 Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro  
 355 360 365

gat cat gtg tgg gca cca gaa gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta 1152  
 Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val



370	375	380	
cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa			1200
Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys			
385	390	395	400
tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt			1248
Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe			
	405	410	415
gga gtg aat tgc gat tct cca aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat			1296
Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn			
	420	425	430
gaa aac aac act ttg aaa gtt tgc gga tta gat gta agt aac gat gtt			1344
Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val			
	435	440	445
tca gat ggc aac ttc tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg			1392
Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp			
	450	455	460
gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt			1440
Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val			
	465	470	475
att gtt gat gaa cca acg acg gta gct att gcg gcg att cca caa agt			1488
Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser			
	485	490	495
agt aaa agt gga tgg gca aat cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg			1536
Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala			
	500	505	510
gaa gat ttt gtc cag caa acg gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca			1584
Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr			
	515	520	525
att aca gga gaa gat gct cct aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa			1632
Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu			
	530	535	540
gaa gat aac aat atg aac aac atc att ctg ttc gtg gga act gat gca			1680
Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala			
	545	550	555
			560

gct gac gtt att tac tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt	1728
Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val	
565 570 575	
gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct	1776
Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser	
580 585 590	
gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct	1824
Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser	
595 600 605	
ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg	1872
Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala	
610 615 620	
tta tca tgg gaa ttt gga tat cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg	1920
Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp	
625 630 635 640	
gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt	1968
Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly	
645 650 655	
gag aat gat tat gta gct ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca	2016
Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala	
660 665 670	
aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac	2064
Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn	
675 680 685	
ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa	2112
Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu	
690 695 700	
tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa	2160
Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys	
705 710 715 720	
att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt	2208
Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg	
725 730 735	
aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga	2256
Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg	

740	745	750	
gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag cgg			2304
Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro			
755	760	765	
ggt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat			2352
Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp			
770	775	780	
gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa			2400
Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys			
785	790	795	800
gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca			2448
Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala			
805	810	815	
gtc aaa aat gag gct aag aaa aaa taa			2475
Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys			
820			

<210> 3  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<400> 3  
 gtgcatttac accattcgag ttagctggcg caaatcttga cccaggtcca gatc 54

<210> 4  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<400> 4  
 ccattcgagt tagctcacgc aaatcttgac ccag 34

<210> 5  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

WO 03/091422

PCT/JP03/05371

<400> 5

ccattcgagt tagctcgtgc aaatcttgac ccag 34

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

caataacatc cattgtaagc ttctcagcac c 31

### Abstract

The present invention is directed to a mutated alkaline cellulase obtained by deleting, from a cellulase having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence exhibiting at least 90% homology therewith, one or more amino acid residue(s) chosen from the 343rd to 377th positions in SEQ ID NO: 1 or from corresponding positions and inserting a peptide having 2 to 15 amino acid residues into at least one of the deleted positions; and to a gene encoding the mutated alkaline cellulase.

The mutated alkaline cellulase has an optimum pH near the pH of the washing liquid (pH: about 10.5) and thus is useful as an enzyme for laundry detergent.